

PCR 法による β 溶血性 *Aeromonas hydrophila* の ヘモリシン遺伝子型別に関する研究

金沢大学医学部医学科微生物学講座 (主任: 中村信一教授)

沖 津 忠 行

β 溶血性 *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) 81株を用い、本菌のヘモリシン遺伝子保有形態による型別を試み、さらに遺伝子型と生物学的諸性状との関連性を検討した。*A. hydrophila* のヘモリシン遺伝子 *ahh1*, *ahh3* および *aerA* 各々の特異的塩基配列に対応する3組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた PCR 法により、ヘモリシン遺伝子を検出した。本 PCR による最小検出量は、*ahh1*, *ahh3*, *aerA* 各遺伝子各々 10^2 コロニー形成単位 (colony-forming unit, CFU), 10^4 CFU, 10^2 CFU であり、DNA 量では 500pg, 1.5ng, 500pg であった。分離株の *ahh1*, *ahh3*, *aerA* 各遺伝子の陽性率は各々 88%, 44%, 57% であり、遺伝子保有形態 (遺伝子型) は *ahh1* 型 (32%), [*ahh1+ahh3*] 型 (4%), [*ahh1+aerA*] 型 (16%), [*ahh1+ahh3+aerA*] 型 (36%), [*ahh3+aerA*] 型 (5%) および本 PCR 陰性 (7%) の 6 型に分けられた。分離株の由来との関連においては、*ahh1* 型が環境由来株に、また [*ahh1+ahh3+aerA*] 型が臨床由来株に最も多くみられ、環境由来株 44 株中 20 株 (45%) が *ahh1* 型、臨床由来株 37 株中 18 株 (49%) が [*ahh1+ahh3+aerA*] 型であった。ヘモリシン遺伝子のうち *ahh1* 遺伝子は、生化学的性状が典型的な *A. hydrophila* と一致する全ての株から検出されたが、アセトイン非産生またはリシン脱炭酸酵素陰性の非典型的性状を示す株からは検出されず、*ahh1* 遺伝子が β 溶血性 *A. hydrophila* 典型株に共通のヘモリシン遺伝子であることが示唆された。培養上清の溶血活性に関しては、低溶血活性株 (≤ 4 溶血単位/100 μ l) は *ahh1* 型であることが多く、また高溶血活性株 (≥ 32 溶血単位/100 μ l) は [*ahh1+ahh3+aerA*] 型であることが多かった ($P < 0.05$)。遺伝子型と O 群血清型との解析においても密接な関係が認められた。すなわち病原株と認識される O11 型および O16 型の 21 株中 18 株 (86%) は、*ahh3* または *aerA* 遺伝子もしくは両遺伝子を保有する遺伝子型であり、一方、非病原株に多いとされる O34 型の 20 株中 16 株 (80%) は *ahh1* 型であった。これらの結果は、ヘモリシン遺伝子型と *A. hydrophila* の病原性との関連を示唆するものであり、さらに PCR 法によるヘモリシン遺伝子型別が *A. hydrophila* 感染症の疫学的研究、また迅速診断法としても有益であることを示唆している。

Key words *Aeromonas hydrophila*, hemolysin gene, typing, PCR

Aeromonas は河川、湖沼等の淡水または汽水域に常在する水棲細菌で、魚類や冷血動物の病原菌として知られる一方、近年、種々の臨床症状を呈する患者から検出されるようになり、ヒトの病原菌としても注目されるようになった^{1)~3)}。*Aeromonas* によるヒトの感染症としては、下痢を主体とした急性胃腸炎や易感染性宿主における敗血症あるいは細菌性心内膜炎等の腸管外感染症が知られていた^{4)~6)}が、1980年頃からの本菌の下痢原性に関する疫学的研究を契機に、本菌による下痢症に対する関心が高まった⁷⁾。下痢症の起因菌となり得る *Aeromonas* は、本菌属のうち運動性を有し中温域で良好な発育を示す菌種であり、*Aeromonas hydrophila*⁸⁾ (*A. hydrophila*) はその代表的なものである。

A. hydrophila の多くはヘモリシン^{9)~10)}、エンテロトキシン^{11)~13)} など種々の外毒素を産生するが、本菌の腸管起病性はヘモリシン産生性およびその性質に符合することが示唆されてい

る。最近、*A. hydrophila* のヘモリシン遺伝子としてエロリシン (aerolysin) 遺伝子 (*aerA* 遺伝子)²⁰⁾、AHH1 遺伝子および AHH2 遺伝子¹³⁾、AHH3 遺伝子¹⁴⁾ の各塩基配列が明らかにされた (後 3 者については上記の記載で発表されたものであるが、本論文では遺伝子の記載法に準じて各々 *ahh1*, *ahh2*, *ahh3* 遺伝子と記載する)。これら遺伝子の *A. hydrophila* 分離株からの検出は、すでに *ahh1* 遺伝子および *ahh3* 遺伝子が DNA-DNA ハイブリダイゼーション法によって実施され^{13)~14)}、また *aerA* 遺伝子については Pollard ら²⁰⁾ が PCR 法により検出した。しかしながら、それらはいずれも各々個別の遺伝子について行われたものであり、*A. hydrophila* に存在する複数のヘモリシン遺伝子の本菌種分離株における保有形態は明らかでない。

著者は、菌株特異的¹³⁾とされた *ahh2* 遺伝子を除いた *ahh1*, *ahh3* および *aerA* の各遺伝子に特異的な 3 組のオリゴヌクレオチドプライマーを用い、PCR 法により β 溶血性 *A.*

平成 7 年 12 月 25 日受付, 平成 8 年 2 月 2 日受理

Abbreviations: *A. caviae*, *Aeromonas caviae*; *A. hydrophila*, *Aeromonas hydrophila*; *A. sobria*, *Aeromonas sobria*; bp, base pair; CFU, colony-forming unit; *E. coli*, *Escherichia coli*; HU, hemolytic unit; PBS, phosphate-buffered saline; *P. shigelloides*, *Plesiomonas shigelloides*; *S. pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*; TSA, tryptic soy agar; TSB, tryptic soy broth

hydrophila 分離株から各遺伝子の検出を実施し、その結果に基づく遺伝子保有形態からヘモリシン遺伝子型別を試みた。また分離株の生化学的性状、溶血活性およびO群血清型を検索し、ヘモリシン遺伝子型と病原性との関連について検討した。

材料および方法

1. 使用菌株 (表1)

ヘモリシン遺伝子の検出対象菌株として、東京都および神奈川県における河川水および井戸水から分離された環境由来44株、同地域における散発下痢患者および東南アジア等からの帰国者下痢患者ふん便から分離された臨床由来37株、計81株のβ溶血性 *A. hydrophila* 分離株を用いた。分離株は Popoff⁹⁾ の分類に従い、乳糖・白糖・鉄 (triple sugar iron, TSI) 寒天培地、硫化水素・インドール・運動性 (sulfate indole motility, SIM) 寒天培地、リシン脱炭酸試験用培地、Voges-Proskauer (VP) 半流動培地 (いずれも栄研, 東京), 1% サリシン加糖分解確認用

Table 1. Strains used

Organism	Source ^{a)}	Number of strains used
Reference strain		
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC7966	Milk	1
<i>Aeromonas hydrophila</i> AH-1	Feces	1
Isolate		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Environmental	44
	Feces	37
<i>Aeromonas sobria</i>	Feces	32
<i>Aeromonas caviae</i>	Feces	10
<i>Aeromonas veronii</i>	Feces	4
<i>Aeromonas torota</i>	Feces	4
<i>Aeromonas jandaei</i>	Feces	2
<i>Vibrio cholerae</i> O1	Feces	5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Feces	5
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Feces	5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Throat	4
<i>Escherichia coli</i>	Feces	4

^{a)} Milk, isolated from tin of milk with a fishy odor; feces, isolated from feces of patients with diarrhea; environmental, isolated from river-water and well-water; throat, isolated from patients of infectious diseases caused by *Streptococcus pyogenes*.

(oxidation fermentation, OF) 培地 (Difco, Detroit, USA), バイル・エスクリン (bile esculin) 寒天培地 (Difco) および API20E (日本バイオメリュー・バイテック, 東京) による生化学的性状の成績から *A. hydrophila* と同定した。

また PCR 法の特異性を確認するために, *A. hydrophila* ATCC7966 株 (*ahh1* 遺伝子陽性株)¹³⁾, *A. hydrophila* AH-1 株 (*ahh3* 遺伝子陽性株)¹⁴⁾ の標準株 2 株と, β溶血性 *A. hydrophila* 以外の *Aeromonas* 5 菌種52株および *Vibrio* 2 菌種10株, *Plesiomonas shigelloides* (*P. shigelloides*) 5 株, *Escherichia coli* (*E. coli*) 4 株並びに *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) 4 株の分離株75株, 合計77株を用いた。

II. PCR によるヘモリシン遺伝子の検出

1. テンプレート DNA の調製

DNA 試料の調製は, 煮沸法およびクロロホルム・フェノール抽出法²⁰⁾ の2通りの方法で行った。煮沸法では, トリプチックソイ寒天 (tryptic soy agar, TSA) (Difco) 平板培地で37℃一夜培養したコロニーの微量をエッペンドルフ形遠心チューブ (アシスト, 東京) に分注した滅菌精製水 100μl に浮遊させ, 沸騰水中で10分間加熱したのち氷中で冷却した上清をとりテンプレート DNA とした。またクロロホルム・フェノール抽出法では, トリプチックソイブイオン (tryptic soy broth, TSB) (Difco) で37℃一夜振盪培養液 1.5ml をエッペンドルフ形の遠心チューブに移し, 25,000×g 1分間遠心分離して得た沈査を 50μl の 0.15M NaCl-0.1M EDTA に懸濁させ, この菌液に 400μl の 0.1M NaCl-0.1M Tris-HCl (pH 8.0)-1% SDS を加えて溶菌後, クロロホルム・フェノール抽出, エタノール沈殿を行いテンプレート DNA を調製した。

2. 標的遺伝子検出プライマーの作製

Aoki ら¹³⁾ および Hirono ら¹⁴⁾ によるヘモリシン遺伝子の塩基配列をもとに, *ahh1* 遺伝子を標的とするセンスストランド *ahh1-s* とアンチセンスストランド *ahh1-a* プライマーを, 同様に *ahh3* 遺伝子を標的とする *ahh3-s* と *ahh3-a* プライマーを設計, 合成した。また, Pollard ら²¹⁾ の報告に基づき *aerA* 遺伝子を標的とする *aerola* および *aerolb* プライマーを合成した。これらのプライマーペアで増幅される各標的遺伝子の DNA 断片のサイズは, *ahh1* 遺伝子, *ahh3* 遺伝子および *aerA* 遺伝子各々285塩基数 (base pair, bp), 217bp, 209bp である (表2)。

3. PCR

PCR は被検株から調製した各々の DNA 試料 5μl (DNA 量約 200ng) をテンプレート DNA とし, エッペンドルフ形遠心

Table 2. Base sequences and locations for *Aeromonas hydrophila* hemolysin gene *ahh1*, *ahh3*- and *aerA*-specific oligonucleotide primers

Toxin gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3') ^{a)}	Location within gene ^{b)}
<i>ahh1</i>	<i>ahh1-s</i>	ATCAATACGCGACCGCAGAG	1,335-1,354
	<i>ahh1-a</i>	ACCCGCTCTGCGCTTGTCGGT	1,600-1,619
<i>ahh3</i>	<i>ahh3-s</i>	CACGCCGCAATCCGCTTATGAC	1,121-1,142
	<i>ahh3-a</i>	CACGGATTGGGACAGAGAGGT	1,317-1,337
<i>aerA</i>	<i>aerola</i>	CCAAGGGGTCTGTGGCGACA	645-664
	<i>aerolb</i>	TTTCACCGGTAACAGGATTG	834-853

^{a)} Sequences derived from *ahh1*, *ahh3* and *aerA* genes.

^{b)} In nucleotides.

チューブ内 50 μ l のチューブ反応系で実施した。反応液は1チューブあたり *Taq* DNA ポリメラーゼ0.5単位, 10 \times 緩衝液 (100mM Tris-HCl 緩衝液, 500mM KCl, 15mM MgCl₂) 5.0 μ l, デオキシスクレオチド混合液 4.0 μ l (いずれも宝酒造, 滋賀), 2.5 μ M センスおよびアンチセンスストランドプライマー各 2.0 μ l で, これにテンプレート DNA を含めた総量が 50 μ l となるように滅菌精製水を加え, ミネラルオイルを重層後, 自動温度変換装置 (ZYMOREACTOR II, アトー, 東京) で反応させた。反応条件は94 $^{\circ}$ C \cdot 5分の前変性後, 94 $^{\circ}$ C \cdot 30秒, 55 $^{\circ}$ C \cdot 30秒, 72 $^{\circ}$ C \cdot 30秒を35サイクル繰り返し, 最後に72 $^{\circ}$ C \cdot 5分の再伸長反応を行った。

4. PCR 産物の電気泳動

PCR 終了後, 各産物の 5 μ l について電気泳動装置 (ミュージード-2, アドバンス, 東京) により 100V 定電圧下で2%アガロースゲル電気泳動を行い, 泳動後ゲルをエチジウムブロマイド染色したのち, トランスイルミネーター (FTI-20S, フナコン, 東京) 上の紫外線下で増幅遺伝子断片を確認, 撮影記録した。なお分子量マーカーとしては, *Hinf*I 消化 ϕ x174 (マーカー9, ニッポンジーン, 東京) を用いた。

5. PCR 産物の確認

検出目的とした各 PCR 産物の塩基配列をもとに, その内側の遺伝子断片を標的とするセンスストランドおよびアンチセンスストランドプライマー (*ahh1* 遺伝子, *ahh1*-ns および *ahh1*-na; *ahh3* 遺伝子, *ahh3*-ns および *ahh3*-na; *aerA* 遺伝子, *aerolna* および *aerolnb*) を作製し, 各々の遺伝子の PCR 産物をテンプレート DNA としたネステッド PCR を上記した PCR と同様の条件下で行い, 各 PCR 産物が目的とした DNA であることを確認した。これらのプライマーペアで増幅される各 PCR 産物中の DNA 断片のサイズは, *ahh1* 遺伝子, *ahh3* 遺伝子および *aerA* 遺伝子各々 128bp, 125bp, 148bp である (表3)。

Ⅲ. 溶血活性の試験

1. 培養上清の調製

β 溶血性 *A. hydrophila* 分離株各々を TSA 平板培地で37 $^{\circ}$ C 24時間培養し, 発育したコロニーの微量を0.5%酵母エキス (Difco) 加 TSB 5ml に接種したのち37 $^{\circ}$ C で18時間振盪培養した。培養後, 培養液を4 $^{\circ}$ C 12,000 \times g で遠心分離を行い上清を採り, それを孔径 0.22 μ m のメンブレンフィルター (マイレクス GV, 日本ミリポア, 東京) で濾過したのち4 $^{\circ}$ C に保存し被検液とした。

2. 溶血活性の測定

1) 1%ヒツジ洗浄赤血球浮遊液の作製

ヒツジ脱繊維血 (日本バイオテスト研究所, 東京) におよそ5倍量の M/15リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.0) (phosphate-buffered saline, PBS) を加え, 低速遠心分離 (1,500 \times g, 10分) により3回洗浄後, 洗浄赤血球を1%の割合に PBS に浮遊させた。

2) 測定法

被検液の2倍段階希釈系列を PBS で作成し, それらの100 μ l を96穴マイクロプレート (Flow, McLean, USA) の各ウェルに注入した。次いで, これらに等量の1%ヒツジ洗浄赤血球浮遊液を加え, 37 $^{\circ}$ C にて1時間, さらに4 $^{\circ}$ C にて2時間静置後溶血を判定した。完全溶血を示した最大希釈倍数の逆数を溶血単位 (hemolytic unit, HU)/100 μ l とした。

3. 統計学的処理

被検株の溶血活性の力価が均一に分布するものと仮定し, その理論分布と実際に得られた溶血活性分布との適合度検定 (the goodness of fit) を χ^2 検定により行った。有意性は危険率5% ($P < 0.05$) で判定した。

Ⅳ. O群血清型別

O群血清型別は, Sakazaki ら²³⁾の方法に従った。すなわち, 被検株の TSA 平板培地一夜培養菌について, 抗O家兔免疫血清 (国立予防衛生研究所細菌部, 島田俊雄博士より分与) を用い, スライド凝集反応法により行った。

成 績

1. PCR 法によるヘモリシン遺伝子の検出

1. PCR 産物の解析

テンプレート DNA の量を約 200ng とし, 各プライマーにより増幅される PCR 産物を解析した。*ahh1* 遺伝子を保有する *A. hydrophila* ATCC7966 株, *ahh3* 遺伝子を保有する *A. hydrophila* AH-1 株および分離株3株 (*A. hydrophila* KH34, *A. hydrophila* KH99, *A. hydrophila* KAE189) に対する PCR の結果を図1に示した。*ahh1*-s および *ahh1*-a プライマーによる *ahh1* 遺伝子の増幅では 285bp 付近 (レーン2, 3) に, *ahh3*-s および *ahh3*-a プライマーによる *ahh3* 遺伝子の増幅では 217bp 付近 (レーン4, 5) に, また *aerola* および *aerolb* プライマーによる *aerA* 遺伝子の増幅では 209bp 付近 (レーン6) にバンドが見られ, いずれも想定されるサイズの DNA 断片であった。

さらに上記した *Aeromonas* 5菌株の各 PCR 産物をテンブ

Table 3. Base sequences and locations of oligonucleotide primers for nested-PCR

Toxin gene ^{a)}	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3') ^{b)}	Location within gene ^{c)}
<i>ahh1</i>	<i>ahh1</i> -ns	CTGGGCATGGCTACGACGTG	1,382-1,402
	<i>ahh1</i> -na	AGTCGATCTTGAACCTCGGTGCT	1,489-1,510
<i>ahh3</i>	<i>ahh3</i> -ns	GCCACCAACTGGTCAAAGACCA	1,164-1,185
	<i>ahh3</i> -na	CAGGACTGGTTGGCAGCAATCT	1,267-1,288
<i>aerA</i>	<i>aerolna</i>	CGAGAAGAAGCCCAAAGCGTT	682-702
	<i>aerolnb</i>	GATAACACCAGGTATTGGACGC	808-829

^{a)} PCR product

^{b)} Sequences derived from *ahh1*, *ahh3* and *aerA* genes.

^{c)} In nucleotides.

レート DNA としたネステッド PCR の結果を図 2 に示した。ahh1-ns および ahh1-na プライマーによる *ahh1* 遺伝子 PCR 産物の増幅では 128bp 付近 (レーン 2, 3) に, ahh3-ns および ahh3-na プライマーによる *ahh3* 遺伝子 PCR 産物の増幅では 125bp 付近 (レーン 4, 5) に, また aerolna および aerolnb プライマーによる *aerA* 遺伝子 PCR 産物の増幅では 148bp 付近 (レーン 6) にバンドが見られ, いずれも想定されるサイズと一致していた。

2. 特異性および感度

上述の 3 組のプライマーを用い, *A. hydrophila* 81 株,

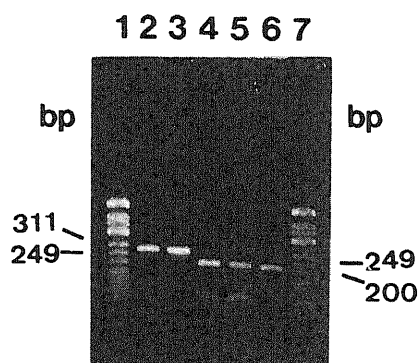


Fig. 1. PCR analysis of hemolysin genes. Lanes 1 and 7, *Hinf*I-digested ϕ x174 as a molecular size marker; lane 2, *A. hydrophila* ATCC7966 amplified with ahh1-s and ahh1-a primers; lane 3, *A. hydrophila* KH34 amplified with ahh1-s and ahh1-a primers; lane 4, *A. hydrophila* AH1 amplified with ahh3-s and ahh3-a primers; lane 5, *A. hydrophila* KH99 amplified with ahh3-s and ahh3-a primers; lane 6, *A. hydrophila* KAE189 amplified with aerola and aerolb primers.

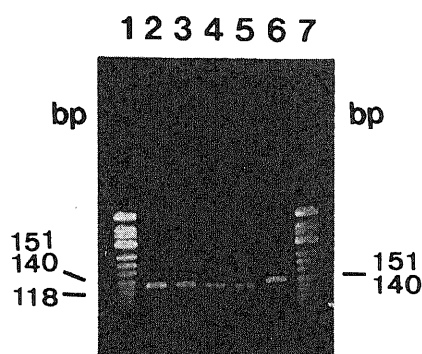


Fig. 2. Nested-PCR analysis of hemolysin genes. Lanes 1 and 7, *Hinf*I-digested ϕ x174 as a molecular size marker; lane 2, *A. hydrophila* ATCC7966 PCR product with ahh1-s and ahh1-a primers amplified with ahh1-ns and ahh1-na primers; lane 3, *A. hydrophila* KH 34 PCR product with ahh1-s and ahh1-a primers amplified with ahh1-ns and ahh1-na primers; lane 4, *A. hydrophila* AH1 PCR product with ahh3-s and ahh3-a primers amplified with ahh3-ns and ahh3-na primers; lane 5, *A. hydrophila* KH99 PCR product with ahh3-s and ahh3-a primers amplified with ahh3-ns and ahh3-na primers; lane 6, *A. hydrophila* KAE189 PCR product with aerola and aerolb primers amplified with aerolna and aerolnb primers.

Aeromonas sobria (*A. sobria*) 32 株, *Aeromonas caviae* (*A. caviae*) 10 株, *Aeromonas veronii* (*A. veronii*) 4 株, *Aeromonas torota* (*A. torota*) 4 株, *Aeromonas jandaei* (*A. jandaei*) 2 株, *P. shigelloides* 5 株, *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) 5 株, *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) O1 5 株, *S. pyogenes* 4 株, *E. coli* 4 株の DNA 量約 200ng に対し PCR を行った。その結果, 供試菌 11 菌種 156 株中, 本 PCR のいずれかに対し陽性反応を示した菌種は *A. hydrophila* のみであり (詳細は後述), 本 PCR は *A. hydrophila* に特異的であった。

煮沸法およびクロロホルム・フェノール抽出法の 2 通りで調製したテンプレート DNA を用いた本 PCR の検出限界は, 各々 *ahh1*, *aerA* 両遺伝子が 10^2 コロニー形成単位 (colony-forming unit, CFU) および DNA 量 500pg, *ahh3* 遺伝子が 10^4 CFU および 1.5ng であった。

3. *A. hydrophila* のヘモリシン遺伝子型

β溶血性 *A. hydrophila* 分離株 81 株について本 PCR を行ったところ, 81 菌株中 75 菌株 (93%) がいずれかのプライマーによる PCR で陽性反応を示し, 6 株はいずれのプライマーによる PCR でも陽性を示さなかった (表 4)。すなわち 81 菌株中 *ahh1*, *ahh3*, *aerA* 各遺伝子が各々 71 株 (88%), 36 株 (44%), 46 株 (57%) の割合に検出された。被検株の各ヘモリシン遺伝子保有形態は, *ahh1*, *ahh3* および *aerA* 各遺伝子の全てを保有する型 (*[ahh1+ahh3+aerA]* 型) が最も多く 29 株 (36%) を占め, 次に *ahh1* 遺伝子単独保有型 (*ahh1* 型), *ahh1* および *aerA* 両遺伝子を保有する型 (*[ahh1+aerA]* 型) が多く各々 26 株 (32%), 13 株 (16%) を占め, 3 者で全体の 84% を占めた。他に *ahh1* および *ahh3* 両遺伝子を保有する型 (*[ahh1+ahh3]* 型), *ahh3* および *aerA* 両遺伝子を保有する型 (*[ahh3+aerA]* 型) が認められたが, それらの菌株数は少なく各々全体の 5% 以下にすぎなかった。また, *ahh3* 遺伝子および *aerA* 遺伝子の単独保有株は認められなかった。以上の PCR の所見から得られた型別をヘモリシン遺伝子型とした。

II. ヘモリシン遺伝子型と生化学的性状

ヘモリシン遺伝子型と生化学的性状との関連性を検討した

Table 4. Hemolysin gene types of 81 strains of β-hemolytic *Aeromonas hydrophila*

Hemolysin gene type ^{a)}	Number (%) of strains
<i>ahh1</i>	26 (32)
<i>ahh1+ahh3</i>	3 (4)
<i>ahh1+aerA</i>	13 (16)
<i>ahh1+ahh3+aerA</i>	29 (36)
<i>ahh3+aerA</i>	4 (5)
<i>ahh3</i>	0
<i>aerA</i>	0
Negative	6 (7)

^{a)} *ahh1*, *ahh1* gene-alone positive; *ahh1+ahh3*, *ahh1* gene- and *ahh3* gene-positive; *ahh1+aerA*, *ahh1* gene- and *aerA* gene-positive; *ahh1+ahh3+aerA*, *ahh1* gene-, *ahh3* gene- and *aerA* gene-positive; *ahh3+aerA*, *ahh3* gene- and *aerA* gene-positive; *ahh3*, *ahh3* gene-alone positive; *aerA*, *aerA* gene-alone positive; negative, *ahh1* gene-, *ahh3* gene- and *aerA* gene-negative.

(表5). 被検株81株は, Popoff の分類による *A. hydrophila* として典型的性状を示すグループと, リシン脱炭酸酵素陰性またはアセトイン非産生の非典型的性状を示すグループに区分できた. 両グループ間の比較において, 典型的性状株71株のすべてが *ahh1* 遺伝子を保有していたのに対し, 非典型的性状株10株はいずれも *ahh1* 遺伝子を保有していなかった.

Ⅲ. 菌株由来とヘモリシン遺伝子型

臨床由来株では [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] 型が37株中18株(49%)で最も多く, 次いで [*ahh1*+*aerA*] 型が10株(27%), *ahh1* 型が6株(16%)の順であった. また, PCR 陰性株は1株(3%)にすぎなかった(表6). 環境由来株では *ahh1* 型が44株中20株(45%)で最も多く, 次いで [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] 型が11株(25%)と多かった. なお PCR 陰性株が5株(11%)と高頻度で認められた.

Ⅳ. 溶血活性とヘモリシン遺伝子型

培養上清の溶血活性が 4HU/100 μ l 以下と低い値を示した33株中17株(52%)が *ahh1* 型であり, *ahh1* 型26株の65%を占めた. 逆に 32HU/100 μ l 以上の高い値を示した29株中20株(69%)が [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] 型であり, [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] 型29株の69%を占めた(表7). また *ahh1* 型26株中 32HU/100 μ l 以上の株および [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] 型で 4HU/100 μ l 以下の株の割合は, 各々26株中2株(8%), 29株中6株(21%)にすぎなかった. 統計学上, *ahh1* 型の株は 4HU/100 μ l 以下が多く 32HU/100 μ l 以上が少ないこと, 逆に [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] 型の株は 4HU/100 μ l 以下が少なく 32HU/100 μ l 以上が多いことが有意 ($P<0.05$) であった.

Ⅴ. ヘモリシン遺伝子型とO群血清型

被検株は27種類のO群血清型に型別され, その内訳は O34

Table 5. Biochemical properties and hemolysin gene type of β -hemolytic *Aeromonas hydrophila* strains

Strains	Number of strains tested	Number (%) of strains shoing hemolysin gene type:							Number (%) of PCR-negative strains
		<i>ahh1</i>	<i>ahh1</i> + <i>ahh3</i>	<i>ahh1</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh1</i> + <i>ahh3</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh3</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh3</i>	<i>aerA</i>	
Typical ^{a)}	71	26(37)	3(4)	13(18)	29(41)	0	0	0	0
LDC ^{b)} -negative	7	0	0	0	0	4(57)	0	0	3(43)
Acetoin ^{c)} -negative	3	0	0	0	0	0	0	0	3(100)

^{a)} Strains consisting with the original description of *A. hydrophila* by Popoff⁸⁾.

^{b)} Production of lysine decarboxylase.

^{c)} Production of acetoin examined by Voges-Proskauer reaction.

Table 6. Source of β -hemolytic *Aeromonas hydrophila* strains and hemolysin gene type

Source ^{a)}	Number of strains tested	Number (%) of strains showing hemolysin gene type:							Number (%) of PCR-negative strains
		<i>ahh1</i>	<i>ahh1</i> + <i>ahh3</i>	<i>ahh1</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh1</i> + <i>ahh3</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh3</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh3</i>	<i>aerA</i>	
Clinical	37	6(16)	1(3)	10(27)	18(49)	1(3)	0	0	1(3)
Environmental	44	20(45)	2(5)	3(7)	11(25)	3(7)	0	0	5(11)

^{a)} Clinical, isolated from feces of patients with diarrhea; environmental, isolated from river- and well-water.

Table 7. Hemolytic activity and hemolysin gene type of β -hemolytic *Aeromonas hydrophila* strains

Hemolytic activity (HU/100 μ l)	Number of strains	Number (%) of strains showing hemolysin gene type:					Number (%) of PCR-negative strain
		<i>ahh1</i>	<i>ahh1</i> + <i>ahh3</i>	<i>ahh1</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh1</i> + <i>ahh3</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh3</i> + <i>aerA</i>	
<2	29	14	2	4	5	1	3
2-4	4	3	0	0	1	0	0
8-16	19	7	1	5	3	2	1
32-64	24	2	0	4	16	1	1
≥ 128	5	0	0	0	4	0	1

Table 8. O-serogroup and hemolysin gene type of β -hemolytic *Aeromonas hydrophila* strains

O-sero-group	Number of strains	Number(%) of strains showing hemolysin gene type:						Number (%) of PCR-negative strains
		<i>ahh1</i>	<i>ahh1</i> + <i>ahh3</i>	<i>ahh1</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh1</i> + <i>ahh3</i> + <i>aerA</i>	<i>ahh3</i> + <i>aerA</i>		
O34	20	16 (80)	2 (10)	1 (5)	1 (5)	0	0	
O16	14	0	0	4 (29)	6 (43)	2 (14)	2 (14)	
O11	7	1 (14)	0	1 (14)	5 (72)	0	0	
O23	4	0	0	1	3	0	0	
O26	4	0	0	2	2	0	0	
O39	3	3	0	0	0	0	0	
O 1	2	0	0	0	1	0	1	
O14	2	1	0	0	0	0	1	
O22	2	0	0	0	2	0	0	
O25	2	1	0	1	0	0	0	
O35	2	0	0	1	1	0	0	
O37	2	0	0	1	1	0	0	
O44	2	0	1	0	1	0	0	
O78	2	1	0	0	1	0	0	
O 2	1	0	0	0	1	0	0	
O 5	1	0	0	0	1	0	0	
O18	1	1	0	0	0	0	0	
O19	1	0	0	0	1	0	0	
O21	1	0	0	0	0	1	0	
O28	1	1	0	0	0	0	0	
O29	1	0	0	1	0	0	0	
O45	1	1	0	0	0	0	0	
O54	1	0	0	0	0	0	1	
O56	1	0	0	0	1	0	0	
O59	1	0	0	0	0	1	0	
O61	1	0	0	0	0	0	1	
O80	1	0	0	0	1	0	0	

型が81株中20株 (25%) で最も多く、次いで O16 型が14株 (17%), O11 型が7株 (9%) の順であった (表8)。すなわち、被検株81株中41株 (51%) がこれらの主要なO群血清型に型別された。臨床材料からの分離頻度が高く、本菌の病原株血清型として認識されている O16 型および O11 型に該当した21株では、O16 型の14株中12株 (86%) と O11 型の7株中6株 (86%) が *ahh3* 遺伝子および *aerA* 遺伝子のいずれかまたは両者を保有していた。さらにこれら18株中16株は *ahh1* 遺伝子を保有していた。これに対して、自然環境に広く分布する本菌の一般的な血清型として知られる O34 型に該当した20株中16株 (80%) は、そのヘモリシン遺伝子型が *ahh1* 型であった。

考 察

臨床、環境の各種材料から分離される *A. hydrophila* の多くは、血液寒天培地上での発育集落の周囲に明瞭な溶血を起こし、かかる溶血性が本菌の腸管病原性あるいは敗血症、創傷感染などの重篤な腸管外感染症の惹起に関連することが確認されている^{12,24-28}。その中で Burke ら²⁵は、乳飲みマウスの腸管内液体貯留を指標とした実験で、*A. hydrophila* の溶血株、すなわちヘモリシン産生株の97%にエンテロトキシン活性を認め、ヘ

モリシンが本菌種の主要な下痢因子であることを強く示唆した。また Stelma ら²⁴は、ウサギ腸管結紮ループによる同様の試験で、ヘモリシンとエンテロトキシンとの産生性に93%の相関を認めた。さらに Vadivelu ら¹⁵は、*A. hydrophila* 臨床分離株の大半にヘモリシンとサイトトキシンの産生を認め、サイトトキシン活性が腸管外感染症の増悪や、急性胃腸炎患者の血性下痢を助長しているものと推測した。以上の裏付けとして、Rose ら³⁰が本菌種の産生するヘモリシンのひとつとしてエロリシン (aerolysin) を分離、精製し、エロリシンは溶血活性のほかにエンテロトキシン活性とサイトトキシン活性をあわせ持っていることを実験的に証明した。しかし、その一方では、溶血が不完全な α 溶血株と溶血活性を欠く非溶血株の中にも下痢原性株が散見されており²⁴、このような現象がヘモリシンの病原的意義を不明瞭にしてきた。Singh ら^{19,27}は、これらの現象の一要因を実験的に模索してきたが、近年、生体外と生体内の異なった条件下では溶血活性も異なること、すなわち、*A. hydrophila* の α 溶血株と非溶血株をウサギ腸管結紮ループ内で連続的に継代した結果、これらの株の大半が明瞭な β 溶血を示すようになり、同時にエンテロトキシン活性も発現することを確認し、本菌のヘモリシン産生は環境に応じて制御されることを示唆した。このことから、おそらく *A. hydrophila* の病原性に関する解釈の相違は、異なった条件下での溶血活性発現の相違がもたらすもので、ヘモリシン産生性の変化がその病原的意義の理解を混乱させてきたものと思われる。

これまで *A. hydrophila* の溶血活性およびヘモリシンの同定は、生物学的あるいは免疫学的手法を主体として行われてきた。しかし最近、感染症の迅速かつ特異的診断の重要性から種々の分子生物学的手法が開発され、なかでも PCR による遺伝子検出は、画期的な遺伝学的手法として病原因子の追求等に著しい普及をみている。すでに本菌種のヘモリシン遺伝子の検出を目的とした PCR には、Pollard ら²¹による *aerA* 遺伝子の検出例があるが、一遺伝子の検出であるために病原株の識別を考察するのに十分とは思われない。本研究では、近年、*A. hydrophila* に複数種のヘモリシン遺伝子の存在が明らかにされたことから、それらの保有形態を解析することによって本菌の病原株の識別が期待できる点に着目し、すでにクローン化されその塩基配列が決定された *ahh1* 遺伝子、*ahh3* 遺伝子および *aerA* 遺伝子を対象とした PCR の手技の確立、その PCR を用いた β 溶血性 *A. hydrophila* 分離株の遺伝子保有形態によるヘモリシン遺伝子型別の試み、それらの遺伝子型と生化学的性状、溶血活性、O群血清型との比較を行い、本菌種の新たな型別法としてのヘモリシン遺伝子型の有用性を検討した。ヘモリシンの生物学的手法による同定では、 β 溶血反応というひとつの表現型が観察できるにすぎず、たとえその反応を支配する因子としての遺伝子が異なっても同様の所見でしか判定できない。これに対して PCR によるヘモリシン遺伝子型別は、迅速性はもとより同様な表現型の発現に関する複数の因子を識別できる優れた手法と言える。

ahh1 遺伝子および *ahh3* 遺伝子を標的とした PCR は、すでに決定された構造遺伝子の塩基配列^{19,21}をもとに、独自に設計したプライマーペアを用いて行った。また *aerA* 遺伝子の検出に関する PCR は、Pollard ら²¹の報告に従った。これらの PCR は、*A. sobria* や *A. caviae* などの他の *Aeromonas* 菌種、また他のヘモリシン産生菌や菌体外毒素産生菌との交差反

応は認められず、その結果は *A. hydrophila* に特異的であり、且つ各遺伝子共に微量のテンプレート DNA からの検出が可能で十分な感度を保持していた。本 PCR システムにより β 溶血性 *A. hydrophila* 分離株 81 株を試験した結果、ヘモリシン遺伝子保有形態は本 PCR 陰性を含めて 6 型に区分され、保有形態による遺伝子型別が可能であることが分かった。*aerA* 遺伝子の検出率は 57% であり、Pollard ら²⁰⁾の結果 78% と比較して低率であった。このことは単に互いの被検株の相違に起因したものと思われるが、彼らの提案した PCR だけでは β 溶血性 *A. hydrophila* のヘモリシン遺伝子検出が十分になされないことは、本菌種に *aerA* 以外のヘモリシン遺伝子が存在することからも明らかである。今回得られた 6 種類のヘモリシン遺伝子型をみると、*aerA* 遺伝子を保有しない *ahh1* 型が 32%, [*ahh1* + *ahh3*] 型も 4% 見られ、本 PCR が本菌種 β 溶血株のヘモリシン遺伝子検出において優れた方法であることが示唆された。さらに *aerA* 遺伝子保有株の遺伝子型の内訳は、[*ahh1* + *aerA*] 型が 16%, [*ahh3* + *aerA*] 型が 5%, [*ahh1* + *ahh3* + *aerA*] 型が 36% であり、*aerA* 遺伝子の単独保有株は認められなかった。*aerA* 遺伝子の支配によって発現するヘモリシンを Rose ら³⁰⁾はエロリシンとして同定し、そのエンテロトキシン活性を明らかにした。しかしながら、本研究での遺伝子型の中に *aerA* 遺伝子単独型が認められなかったことは、彼らの言うエロリシンが *aerA* 遺伝子のみならず他のヘモリシン遺伝子も関与して発現したことも考えられ、さらにこのことは *aerA* 遺伝子が本菌種の主たるヘモリシン遺伝子ではないことを意味し、ヘモリシン遺伝子の進化を考える上で興味ある知見である。このように本遺伝子型別は、本菌種 β 溶血株のヘモリシンを指標とした病原株の同定に際し、新たな有用な遺伝学的手法であることを示唆している。

本研究で得られたヘモリシン遺伝子型と、 β 溶血性 *A. hydrophila* の生化学的性状、培養上清の溶血活性および O 群血清型との関連を解析した結果、Popoff⁹⁾の分類に基づく本菌の典型的性状を示す分離株 71 株は、そのすべてが *ahh1* 遺伝子を保有していた。これに対してリシン脱炭酸酵素陰性またはアセトイン非産生の非定型分離株 10 株は、いずれも *ahh1* 遺伝子を保有していなかった。このことから *ahh1* 遺伝子は典型的性状を示す本菌種 β 溶血株に共通のヘモリシン遺伝子であり、逆に本菌種の生化学的性状が非定型な株には *ahh1* 遺伝子が存在しない可能性が示された。また、分離株の培養上清の溶血活性と遺伝子型との関連は、溶血活性が $\leq 4\text{HU}/100\mu\text{l}$ と低かった 33 株の 52% が *ahh1* 型であったのに対し、 $\geq 32\text{HU}/100\mu\text{l}$ 以上の高い活性を示した 29 株に本遺伝子型は 7% の割合に認められたにすぎず、逆に高い活性を示した 29 株の 69% が [*ahh1* + *ahh3* + *aerA*] 型であり両者の差は有意であった。今回の成績のみで溶血活性と遺伝子型との関係を明確にすることは、遺伝子の保有と溶血活性とが必ずしも一致していない点も見られることから難しいが、*ahh1* 遺伝子は β 溶血性 *A. hydrophila* 株が本来的に保有する遺伝子であることが示唆されたことを併せて考えると、*ahh1* 型株の病原的意義は *ahh3* または *aerA* 遺伝子もしくは両者を保有する遺伝子型株と比較して低いように思われる。このことはまた遺伝子型と O 群血清型との関連においても見られた。すなわち、病原株と認識される O 群血清型である O16 型および O11 型に該当する株のほとんどが、*ahh3* または *aerA* 遺伝子もしくは両者を保有する遺伝子型であった。以上

のことは、 β 溶血性 *A. hydrophila* の病原株は、*ahh3* および *aerA* 遺伝子の保有と高い関連を持つことを強く示唆したものと思われる。なお、本 PCR においてヘモリシン遺伝子が検出されなかった未検出型株は、いずれも β 溶血を示すことから、今回標的とした遺伝子以外のヘモリシン遺伝子を保有するものと考えられ、今後、これらの遺伝子を明らかにすることによって、さらに精度の高いヘモリシン遺伝子型別が可能になると思われる。

ヘモリシン遺伝子型別は、*Aeromonas* 感染症の疫学的研究の手法として、また迅速診断法として有益であり、医学および公衆衛生学領域での本感染症の解明に関する研究に寄与できるものと考えられる。

結 論

A. hydrophila の溶血活性に関与する複数のヘモリシン遺伝子 (*ahh1*, *ahh3*, *aerA*) に着目し、 β 溶血性 *A. hydrophila* 分離株 81 株について PCR 法によりヘモリシン遺伝子の保有形態を求め、その所見からヘモリシン遺伝子型別を試みた。また本遺伝子型と本菌株の生化学的性状、溶血活性、O 群血清型とを比較することによってヘモリシン遺伝子型別の有用性を検討した結果以下の結論を得た。

1. *ahh1*, *ahh3*, *aerA* 各遺伝子を標的 DNA とした PCR は、*A. hydrophila* 菌種に特異的で、検出限界は各々 10^4CFU , 10^4CFU , 10^2CFU および DNA 量 500pg, 1.5ng, 500pg であった。

2. β 溶血性 *A. hydrophila* 分離株の *ahh1*, *ahh3*, *aerA* 各遺伝子の検出率は各々 88%, 44%, 57% で、複数の遺伝子を保有する株が認められ、遺伝子保有形態 (遺伝子型) は *ahh1* 型, [*ahh1* + *ahh3*] 型, [*ahh1* + *aerA*] 型, [*ahh1* + *ahh3* + *aerA*] 型, [*ahh3* + *aerA*] 型および本 PCR 陰性の 6 型であった。本成績から β 溶血性 *A. hydrophila* は少なくとも 6 種類の遺伝子型に型別できることが示された。

3. *ahh3* 遺伝子および *aerA* 遺伝子を単独に保有する株は認められず、被検株の 5% が [*ahh3* + *aerA*] 型であった以外、両遺伝子の一方か両方を保有する株はいずれも *ahh1* 遺伝子も保有していた。このことから、*ahh1* 遺伝子は β 溶血性 *A. hydrophila* が広く保有する本来的なヘモリシン遺伝子であることが示唆された。

4. *ahh1* 遺伝子は典型的な生化学的性状を示す β 溶血性 *A. hydrophila* に共通のヘモリシン遺伝子であり、逆に本菌種の生化学的性状が非定型な株には *ahh1* 遺伝子が存在しない可能性が示された。

5. 臨床由来株では [*ahh1* + *ahh3* + *aerA*] 型が多数 (49%) で *ahh1* 型が少数 (16%) であったのに対して、環境由来株では [*ahh1* + *ahh3* + *aerA*] 型が少数 (25%) で *ahh1* 型が多数 (45%) であり、由来間での遺伝子型の分布は異なっていた。

6. 培養上清の溶血活性が $\leq 4\text{HU}/100\mu\text{l}$ と低かった株の 52% が *ahh1* 型であったのに対し、 $\geq 32\text{HU}/100\mu\text{l}$ 以上の高い活性を示した株に本遺伝子型は 7% の割合に認められたにすぎず、逆に高い活性を示した株の 69% が [*ahh1* + *ahh3* + *aerA*] 型であり両者の差は有意であった。

7. 病原株と認識される O 群血清型である O16 型および O11 型に該当した株のほとんど (86%) が、*ahh3* または *aerA* 遺伝子もしくは両者を保有する遺伝子型であった。一方、自然

環境に広く分布する一般的な血清型とされる O34 型に該当した株の多く (80%) は *ahhI* 型であった。

以上の結果はヘモリシン遺伝子型と病原性との関連を示唆するものであり、本 PCR 法によるヘモリシン遺伝子型別が *A. hydrophila* 感染症の疫学的研究、また迅速診断法として有益な手法となり得ることを示唆している。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師中村信一教授に心からの謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり多大な御協力を戴きました微生物学教室員各位、杏林大学保健学部森田耕司講師、国立予防衛生研究所腸管系細菌室島田俊雄室長および外来性細菌室伊藤健一郎主任研究官、神奈川県衛生研究所細菌病理部山井志朗部長はじめ部員各位に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Hazen, M. C., Fleirman, C. B., Hirsch, R. P. & Esch G. W.: Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 371-378 (1978).
- 2) Joseph, S. W., Daily, O. P., Hunt, W. S., Seidler, R. J., Allen, D. A. & Colwell, R. R.: *Aeromonas* primary wound infection of a diver in polluted waters. *J. Clin. Microbiol.*, 10, 46-49 (1979).
- 3) Kapers, J. B., Lockmans, H., Colwell, R. R. & Joseph, S. W.: *Aeromonas hydrophila*: ecology and toxigenicity of isolates from an estuary. *J. Appl. Bacteriol.*, 50, 359-377 (1981).
- 4) Kindsohuh, M., Pickering, L. K., Cleary, T. G. & Ruiz-Palacios, G.: Clinical and biochemical significance of toxin production by *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 916-921 (1987).
- 5) Gracey, M., Burke, V. & Robinson, J.: *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Lancet*, 2, 1304-1305 (1982).
- 6) Janda, J. M., Bottone, E. J., Skinner, C. V. & Calcattarra, D.: Phenotypic markers associated with gastrointestinal *Aeromonas hydrophila* isolates from symptomatic children. *J. Clin. Microbiol.*, 17, 588-591 (1983).
- 7) 浅尾 努: *Aeromonas*. 食水系感染症と細菌性食中毒 (坂崎利一編), 第1版, 251頁, 中央法規出版, 東京, 1991.
- 8) Popoff, M.: *Aeromonas*. In N. R. Krieg & J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., P545-548, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- 9) Janda, J. M. & Duffey, P. S.: Mesophilic aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Rev. Infect. Dis.*, 10, 980-997 (1988).
- 10) Howard, S. P. & Buckley, J. T.: Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J. Bacteriol.*, 163, 336-340 (1985).
- 11) Chakraborty, T., Huhle, B., Bergbauer, H. & Goebel, W.: Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 167, 368-374 (1986).
- 12) Kozaki, S., Kato, K., Asao, T., Kamata, Y. & Sakaguchi, G.: Activities of *Aeromonas hydrophila* hemolysins and their interaction with erythrocyte membranes. *Infect. Immun.*, 55, 1594-1599 (1987).
- 13) Aoki, T. & Hirono, I.: Cloning and characterization of the haemolysins determinants from *Aeromonas hydrophila*. *Fish. Dis.*, 14, 303-312 (1991).
- 14) Hirono, I., Aoki, T., Asao, T. & Kozaki, S.: Cloning of hemolysin genes from *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria*. *Micribiol. Pathog.*, 13, 433-446 (1992).
- 15) Vadivelu, J., Puthucherry, S. D. & Navaratnam, P.: Exotoxin profiles of clinical isolates of *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.*, 35, 363-367 (1991).
- 16) Ljungh, A.: *Aeromonas* toxin and other virulence factors. *Experientia*, 43, 367-368 (1987).
- 17) Turnbull, P. C. B., Lee, J. V. & Miliotis, M. D.: Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species. *J. Clin. Microbiol.*, 19, 175-180 (1984).
- 18) Chopra, A. K., Houston, C. W., Genaux, C. T., Dixon, J. D. & Kurosky, A.: Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive by *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.*, 24, 661-664 (1986).
- 19) Singh, D. V. & Sanyal, S. C.: Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.. *J. Med. Microbiol.*, 36, 269-272 (1992).
- 20) Howard, S. P., Garland, W. J., Green, M. J. & Buckley, J. T.: Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, 169, 2869-2871 (1987).
- 21) Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. & Rozee, K. R.: Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 28, 2477-2481 (1990).
- 22) 村松正實: ラボマニュアル遺伝子工学, 第1版, 29-30頁, 丸善, 東京, 1989.
- 23) Sakazaki, R. & Shimada, T.: O-Serogrouping scheme for mesophilic *Aeromonas* strains. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 37, 247-255 (1984).
- 24) Stelma, G. N. Jr., Johnson, C. H. & Spaulding, P.: Evidence for the direct involvement of β -hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. *Curr. Microbiol.*, 14, 71-77 (1986).
- 25) Burke, V., Robinson, J., Cooper, M., Beaman, J., Partridge, K., Peterson, D. & Gracey, M.: Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1146-1149 (1984).
- 26) Agger, W., McCormick, J. D. & Gurwith M. J.: Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, 21, 909-913 (1985).
- 27) Singh, D. V. & Sanyal, S. C.: Production of haemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas* spp.. *J. Med. Microbiol.*, 262-267 (1992).
- 28) Chakraborty, T., Montenegro, M. A., Sanyal, S. C.,

Helmuth, R., Bulling, E. & Timmis, K. N.: Cloning of enterotoxigenic from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.*, **46**, 435-440 (1984).

29) Scheffer, J., König, W., Braun, V. & Goebel, W.: Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory

mediators from various cells. *J. Clin. Microbiol.*, **26**, 544-551 (1988).

30) Rose, J. M., Houston, C. W., Coppenhaver, D. H., Dixon, J. D. & Kurosky, A.: Purification and chemical characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by a human isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*, **57**, 1165-1169 (1989)

Hemolysin Gene Typing of β -hemolytic *Aeromonas hydrophila* by Using PCR Tadayuki Okitsu, Department of Bacteriology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., **105**, 230—238 (1996)

Key words *Aeromonas hydrophila*, hemolysin gene, typing, PCR

Abstract

The present study was performed to characterize β -hemolytic *Aeromonas hydrophila* (*A. hydrophila*) strains by hemolysin gene typing and to examine the relationship between hemolysin gene type and biological properties. Three pairs of synthetic oligonucleotide primers were used in PCR technique to detect the hemolysin genes *ahh1*, *ahh3* and *aerA* in 81 isolates of β -hemolytic *A. hydrophila*. The minimum amounts detected by the PCR were 10^2 colony-forming unit (CFU) or 500pg DNA for *ahh1* and *aerA* genes and were 10^4 CFU or 1.5ng DNA for *ahh3* gene. Rates (%) of *ahh1*, *ahh3* and *aerA* gene-positive strains were 88, 44 and 57%, respectively, and strains tested were grouped into 6 hemolysin gene types; *ahh1* (32%), [*ahh1*+*ahh3*] (4%), [*ahh1*+*aerA*] (16%), [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] (36%), [*ahh3*+*aerA*] (5%) and hemolysin gene-negative type (7%). In relation to the source of the strains, *ahh1* and [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] types were most frequently found in environmental and clinical strains, respectively; 20 (45%) of 44 environmental strains were *ahh1* type and 18 (49%) of 37 clinical strains were [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] type. All of the typical strains consisting with the original description of *A. hydrophila* carried *ahh1* gene, while atypical strains showing acetoin- or lysine decarboxylase-negative reaction did not, indicating that the *ahh1* gene is common in the typical *A. hydrophila* strains. In the test for hemolytic activity in culture supernatant, it was shown that rates of strains with low (≤ 4 HU/100 μ l) and high (≥ 32 HU/100 μ l) hemolytic activities are significantly high in *ahh1* and [*ahh1*+*ahh3*+*aerA*] type, respectively, in comparison with each other ($P < 0.05$). The analysis of the O-serogroup revealed that there is a relationship between the hemolysin gene type and the O-serogroup; 18 (86%) of 21 strains belonged to the serogroup O11 or O16, which is recognized to be pathogenic, carried *ahh3*, *aerA* gene or both, while 16 (80%) of 20 serogroup O34 strains, which are mostly non-pathogenic, carried the *ahh1* gene alone. These results suggest that there is a relationship between the hemolysin gene types and pathogenesis of *A. hydrophila*, and further that hemolysin gene typing with PCR is useful for epidemiological survey as well as the rapid diagnosis of diseases caused by the organism.